

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan enam kelompok perlakuan yakni kontrol positif, kontrol negatif, serta empat kelompok eksperimental (1%, 3%, 5% dan 7%) untuk mengetahui potensi antelmintik ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) terhadap mortalitas cacing *Ascaris suum*.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang diperoleh dari perkebunan tembakau di Desa Jatipunggur, Kecamatan Lengkung, Kabupaten Nganjuk.

4.2.2 Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji yakni cacing *Ascaris suum* dewasa yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Surabaya. Dengan Jumlah sampel sebanyak 5 (lima) ekor pada setiap perlakuan dan dilakukan replikasi sebanyak 5 (lima) kali. Penentuan perlakuan replikasi pada masing-masing kelompok konsentrasi berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Frederer sebagai berikut :

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

Keterangan :

t : Banyaknya Perlakuan

r : Banyaknya Replikasi

Perhitungan :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r \geq 15 + 5$$

$$r \geq 20 / 5$$

$$r \geq 4$$

$$r \geq 5 \text{ kali replikasi}$$

4.3 Waktu dan Tempat Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Surabaya yang berlokasi di Jalan Karangmenjangan No. 18A Surabaya.

4.3.2 Waktu Penelitian

Waktu dari penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2021 hingga bulan Mei 2022.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas adalah ekstrak yang diperoleh dari daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dan 7%, serta kontrol positif dan kontrol negatif.

4.4.2 Variabel Terikat

Pada penelitian ini variabel terikat adalah waktu kematian cacing *Ascaris suum* setelah pemberian ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dan 7%.

4.5 Definisi Operasional Variabel

4.5.1 Ekstrak Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*)

Daun tembakau segar dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan pada tempat terhindar dari sinar matahari langsung dan dibuat dalam sediaan simplisia. Kemudian diekstrak menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96 %.

4.5.2 Jenis Cacing

Jenis cacing yang digunakan dalam penelitian ini *Ascaris suum* yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Surabaya tanpa membeda-bedakan jenis kelamin jantan maupun betina.

4.5.3 Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini ialah obat antelmintik levamisol 500mg yang dilarutkan dalam 50 mL aquadest. Sedangkan sebagai kontrol negatif menggunakan larutan NaCl 0,9% fisiologis.

4.5.4 Efek Antelmintik

Efek antelmintik dari ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) ditandai dengan terjadinya paralisis hingga mortalitas cacing *Ascaris suum* setelah pemberian ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*).

4.5.5 Waktu Mortalitas Cacing *Ascaris suum*

Waktu mortalitas yang dibutuhkan untuk seluruh cacing *Ascaris suum* pada masing-masing konsentrasi ditandai dengan tidak adanya respon gerak setelah dilakukan pengusikan. Pengamatan dilakukan dengan interval waktu setiap 15 menit hingga terjadi kematian cacing.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain labu ukur, mortir, wadah maserasi, *rotary evaporator*, cawan, pipet maat, *shaker waterbath*, batang pengaduk, stopwatch.

4.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang telah dibuat menjadi sediaan simplisia, etanol 96%, NaCl 0,9%, Tablet Levamisol 500mg, Aquadest serta cacing *Ascaris suum* sebagai objek penelitian.

4.6.3 Prosedur Pembuatan Simplisia Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*).

1. Daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang diperoleh dari perkebunan tembakau di Desa Jatipunggur, Kecamatan Lengkon, Kabupaten Nganjuk kemudian dikirimkan ke UPT Laboratorium Herbal Materia Medica, Malang untuk dilakukan identifikasi serta determinasi.
2. Melakukan sortasi basah dengan cara memisahkan daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dari bahan asing yang terbawa pada saat pemanenan, serta melakukan pemilihan daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang sehat.
3. Mencuci daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan menggunakan air mengalir. Kemudian melakukan perajangan daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) untuk mempermudah proses pengeringan.

4. Melakukan proses pengeringan dengan bantuan oven pada suhu 50°C hingga berkurang 60-90% dari bobot awal.
5. Melakukan sortasi kering dengan cara memisahkan simplisia dari pengotor yang masih tertinggal, kemudian daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dihaluskan dengan menggunakan bantuan blender.

4.6.4 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*).

1. Bahan uji daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang telah dibuat dalam sediaan simplisia kemudian dikirimkan ke Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk proses pembuatan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*).
2. Menimbang sebanyak 500 gram simplisia daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi dengan menggunakan pelarut yakni etanol 96%.
3. Merendam simplisia daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter, kemudian diaduk hingga homogen, dan didiamkan selama 5x24 jam.
4. Menyaring hasil rendaman simplisia daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) menggunakan bantuan kertas saring.
5. Memasukkan filtrat ke dalam alat *rotary evaporator* dengan suhu 50-55°C yang bertujuan untuk menghilangkan kandungan pelarut etanol 96% dalam ekstrak.
6. Ekstrak pekat daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) disimpan dalam suhu 4°C sebelum digunakan.

4.6.5 **Prosedur Pembuatan Deret Konsentrasi Ekstrak Daun Tembakau** *(Nicotiana tabacum).*

1. Pembuatan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 1%.
 - Memipet 1 mL ekstrak kental daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan menggunakan maat pipet.
 - Kemudian memasukkan 1 mL ekstrak kental daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dalam labu ukur 100 mL.
 - Menambahkan larutan NaCl 0,9% hingga tanda batas, kemudian homogenkan.
2. Pembuatan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 3%.
 - Memipet 3 mL ekstrak kental daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan menggunakan maat pipet.
 - Kemudian memasukkan 3 mL ekstrak kental daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dalam labu ukur 100 mL.
 - Menambahkan larutan NaCl 0,9% hingga tanda batas, kemudian homogenkan.
3. Pembuatan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 5%.
 - Memipet 5 mL ekstrak kental daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan menggunakan maat pipet.
 - Kemudian memasukkan 5 mL ekstrak kental daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dalam labu ukur 100 mL.

- Menambahkan larutan NaCl 0,9% hingga tanda batas, kemudian homogenkan.
4. Pembuatan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 7%.
- Memipet 7 mL ekstrak kental daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan menggunakan maat pipet.
 - Kemudian memasukkan 7 mL ekstrak kental daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dalam labu ukur 100 mL.
 - Menambahkan larutan NaCl 0,9% hingga tanda batas, kemudian homogenkan.

4.6.6 Prosedur Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Pembuatan larutan NaCl 0,9% fisiologis yang digunakan sebagai larutan kontrol negatif, dengan prosedur sebagai berikut :

1. Menimbang 9 gram NaCl dengan menggunakan neraca analitik.
2. Melarutkan dengan menggunakan 1000 mL aquades. Homogenkan.
3. Melakukan sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.
4. Larutan NaCl 0,9% fisiologis dapat digunakan sebagai kontrol negatif.

4.6.7 Prosedur Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Pembuatan larutan Levamisol 500mg yang digunakan sebagai larutan kontrol positif, dengan prosedur sebagai berikut :

1. Menghaluskan tablet Levamisol 500 mg dengan batuan mortir.
2. Melarutkan serbuk Levamisol dengan 50 mL aquadest.
3. Menghomogenkan larutan levamisol yang selanjutnya dapat digunakan sebagai kontrol positif.

4.6.8 Pengamatan Efek Antelmintik Ekstrak Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*)

Pengamatan daya antelmintik ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dan 7% terhadap cacing *Ascaris suum* secara in vitro. Sebagai pembanding digunakan larutan levamisol 500mg sebagai kontrol positif dan larutan NaCl 0,9% fisiologis sebagai kontrol negatif, dengan prosedur sebagai berikut :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk pengamatan daya antelmintik.
2. Memipet masing-masing sebanyak 20 mL larutan kontrol positif, larutan kontrol negatif, serta larutan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) tiap-tiap konsentrasi yakni 1%, 3%, 5% dan 7% pada masing masing cawan, kemudian diberikan label pada masing-masing konsentrasi.
3. Memasukkan 5 ekor cacing *Ascaris suum* pada masing-masing cawan yang telah diisi dengan kontrol positif, kontrol negatif, serta larutan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) tiap-tiap konsentrasi yakni 1%, 3%, 5% dan 7%.
4. Melakukan pengamatan pergerakan cacing *Ascaris suum* pada interval waktu setiap 15 menit dengan menyentuh tubuh cacing *Ascaris suum* menggunakan pinset anatomis.
5. Mencatat jumlah kematian cacing dengan waktu kematian cacing *Ascaris suum*.

4.7 Teknik Pengumpulan dan Analisa Data

4.7.1 Teknik Pengumpulan Data

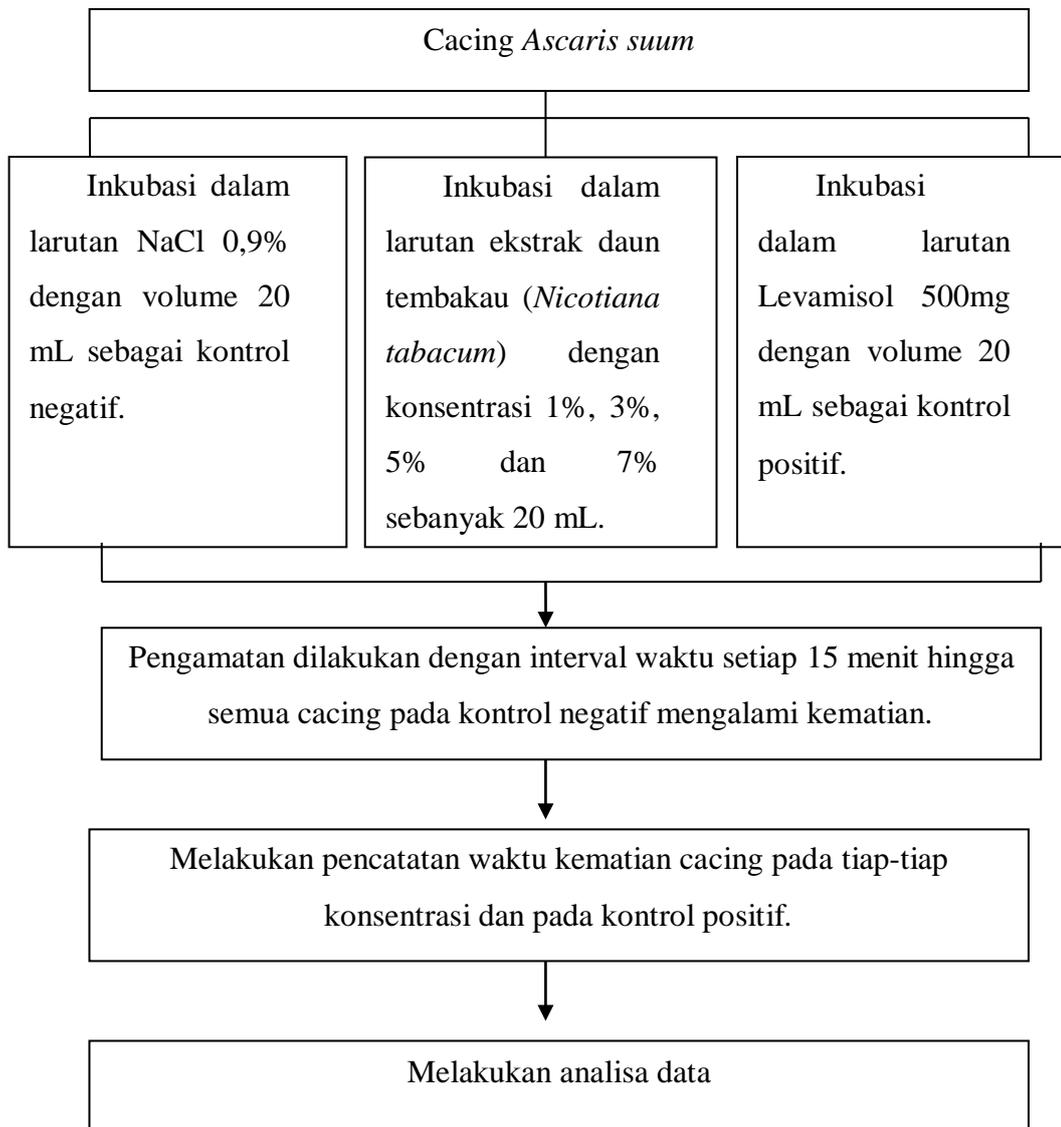
Dalam penelitian ini menggunakan teknik pengumpulan data dengan menggunakan data primer yang diperoleh dari hasil observasi (pengamatan secara langsung) yaitu dengan mengamati waktu mortalitas cacing *Ascaris suum* setelah pemberian ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dan 7%. Kontrol negatif digunakan sebagai pemantau kualitas ketahanan dari sampel cacing *Ascaris suum* yang digunakan dalam penelitian ini.

Mortalitas cacing disimpulkan ketika cacing *Ascaris suum* kehilangan motilitasnya setelah dilakukan pengusikan dengan menggunakan pinset anatomis. Interval waktu pengamatan mortalitas cacing yakni setiap 15 menit. Jumlah mortalitas cacing *Ascaris suum* pada tiap interval waktu disusun dalam bentuk data kemudian diolah menggunakan perangkat pengolahan data SPSS.

4.7.2 Teknik Analisa Data

Data yang dianalisis dengan menggunakan metode analisa data uji normalitas *Shapiro Wilk*. Kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji homogenitas. Apabila data berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) analisa data menggunakan uji *One Way Anova*, namun apabila data tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$) menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilanjutkan dengan menggunakan uji post-Hoc untuk mengetahui perbedaan daya antelmintik ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dan 7% terhadap mortalitas cacing *Ascaris suum*.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.8. Alur Penelitian

Keterangan :

Cacing *Ascaris suum* diinkubasi dalam larutan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dan 7% sebanyak 20 mL secara in vitro. Pada kontrol positif cacing *Ascaris suum* diinkubasi dalam larutan levamisol 500 mg dengan volume 20 mL. Sedangkan untuk kontrol negatif cacing *Ascaris suum* diinkubasi dalam larutan NaCl 0,9% dengan volume 20 mL.

Pengamatan dilakukan dengan interval waktu setiap 15 menit hingga semua cacing *Ascaris suum* pada kontrol negatif mengalami kematian dan dilakukan pencatatan waktu kematian cacing, setelah data diperoleh dilanjutkan dengan proses analisa data.